

10/508860  
PCT/JP 03/03521

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

SEP 24 2004

24.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月25日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-082821

[ST.10/C]:

[JP2002-082821]

出 願 人

Applicant(s):

帝人株式会社

REC'D 16 MAY 2003

P.O.

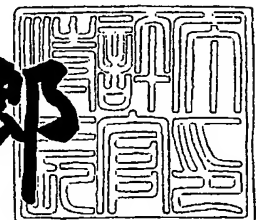
PCT

~~PRIORITY DOCUMENT~~  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 2日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3031256

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 P35754

【提出日】 平成14年 3月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/483

【発明者】

【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内

【氏名】 酒井 満

【発明者】

【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内

【氏名】 杉本 圭則

【特許出願人】

【識別番号】 000003001

【氏名又は名称】 帝人株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077263

【弁理士】

【氏名又は名称】 前田 純博

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010250

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701951

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体試料中補酵素A類の測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料中の補酵素A類の濃度を測定する方法であり、生体試料を強酸性溶液を使用して抽出するステップ、内部標準物質を添加するステップ、固相抽出ステップ、LC-MSを用いて検出するステップを備えることを特徴とする補酵素A類の測定方法。

【請求項2】 該補酵素A類が脂肪酸補酵素Aエステル類であり、該内部標準物質が、該補酵素A類の構造類似体であることを特徴とする請求項1記載の補酵素A類の測定方法。

【請求項3】 該脂肪酸補酵素Aエステル類が、主炭素鎖の炭素数が2～8個の短鎖脂肪酸補酵素Aエステルであり、該構造類似体が該補酵素A類との炭素数差が3個以内であり、且つアシル基の主炭素鎖の水素が3個以上重水素に置換されたものであることを特徴とする請求項2記載の補酵素A類の測定方法。

【請求項4】 該補酵素A類がマロニル補酵素Aであり、該構造類似体がスクシニル補酵素A-d4体であることを特徴とする請求項3記載の補酵素A類の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体試料中の補酵素A類（Coenzyme A類、以下CoA類と称す。）の定量測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

CoA類は脂肪酸の生合成、分解、転移、ホルモン合成と調節、TCAサイクルなどの経路に含まれ、生命機能維持に欠かせない重要な化合物である。脂質代謝の機能解析研究などにおいて、CoA類のマーカーとしての役割が重要視され、生体試料中のCoA類の濃度を正確に測定する方法が求められてきた。

【0003】

このような中で、脂質代謝機構の構成成分であるマロニルCoAは、ミトコンドリアに於ける脂肪酸酸化と脂質合成に関与する為、脂質代謝調節の上で重要な役割を担い、心臓や骨格筋での脂質エネルギー代謝、大脳視床下部におけるニューロペプチドYの発現制御、食物摂取、エネルギー消費制御など重要な調節因子として脚光を浴びている。

## 【 0 0 0 4 】

かかるCoA類の測定方法としては、古くから酵素法やHPLC法など各種方法が開発されている。例えば酵素法による測定方法としてはGuynnらの方法 (Guynn,R.W.,Methods Enzymol.,1975,35,312) やMcGarryらの方法 (McGarry,J.D.,J.Biol.Chem.,1978,253,22,8291) などがある。これは、例えばマロニルCoAを測定対象にするときは放射能ラベルしたアセチルCoAのマロニルCoA依存的な取り込みを測定するものである。しかし、この方法は特定のCoA類が測定対象となり、汎用性がなく、測定時に共存する他のCoA類によって調節がかかり、真の値を示さない場合があるという欠点がある。また操作が煩雑である。

## 【 0 0 0 5 】

UV-HPLC法 (例えばHosokawa,Y.,Anal.Biochem.,1978,91,1,370、Demoz,A.,J.Chromatogr.,B:Biomed.Appl.,1995,667,1,148など参照。) によるCoA類の測定の報告例は非常に多い。測定する生体組織としても筋肉、心臓、肝臓中などの濃度が測定されている。しかし、UV-HPLC法は感度が低いため、臓器のように夾雑物が多い試料中では再現性が悪く、特に脳中濃度は測られておらず、より高感度、再現性に優れた方法が期待されている。

## 【 0 0 0 6 】

測定方法としてマスマススペクトルを利用した方法として、LC-MS法 (Buchholz,A.,Anal.Biochem.,2001,295,129を参照) が開発されている。かかる方法は菌中のアセチルCoA濃度をイオントラップ型マスマススペクトロメータで測定したものである。かかる方法では測定対象であるCoAの検出とピーク分離には成功しているが、絶対検量線法を採用し、内部標準物質を使用しておらず、正確性、再現性を得るには不十分である。また測定対象がアセチルCoAであり、極性が低く臓器中濃度が高いなどの優位な点があり、マロニルCoAなどの組織中の濃度が低く、極性

の高い他のCoA類の測定には充分に対応できない問題がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記問題点を解決するものであり、生体試料中CoA類の高感度で再現性に優れた濃度測定法を提供するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、上記のような課題のもとに鋭意研究を重ねた結果、以下の方法を見出した。すなわち本発明は、生体試料中の補酵素A類の濃度を測定する方法であり、生体試料を強酸性溶液を使用して抽出するステップ、内部標準物質を添加するステップ、固相抽出ステップ、LC-MSを用いて検出するステップを備えることを特徴とする補酵素A類の測定方法を提供するものである。

【0009】

また本発明は、かかる補酵素A類が脂肪酸補酵素Aエステル類であり、該内部標準物質が、該補酵素A類の構造類似体であることを特徴とし、特に該脂肪酸補酵素Aエステル類が、主炭素鎖の炭素数が2～8個の短鎖脂肪酸補酵素Aエステルであり、該構造類似体が該補酵素A類との炭素数差が3個以内であり、且つアシル基の主炭素鎖の水素が3個以上重水素に置換されたもの、その中でも該補酵素A類がマロニルCoAであり、該構造類似体がスクシニルCoA-d4体であることを特徴とする補酵素A類の測定方法を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明は、CoA類の測定方法であり、生体試料からの強酸性溶液による抽出、内部標準物質の添加、HPLC注入サンプルの調整、必要に応じた濃縮操作、CoA類と内部標準物質のHPLC分離、CoA類と内部標準物質の質量分析計による検出、検出された測定対象CoAと内部標準物質の面積比からの定量で構成される。

【0011】

CoA類の生体試料からの強酸性溶液による抽出において、生体試料とはCoA類が内在するすべての試料が対象であり、具体例としては、人や動物の臓器、人、動

物、植物などの組織、細胞、菌などが挙げられる。臓器のなかでも特に筋肉、心臓、肝臓、脳中のCoA類の測定が重要である。

#### 【0012】

測定対象のCoA類としてはチオール基がアシル化されたアシルCoA類や、チオール基が酸化的に結合したCoA酸化体類、1級アミンがアシル化されたN-アシルCoA類が挙げられる。N-アシルCoA類は生体中には存在しないが、放射能ラベル体を使用して生体機能の測定の際に人工的に合成されるものであり、医薬品開発の効果評価の為に重要である。

#### 【0013】

アシルCoA類の具体例として、アセトアセチルCoA、マロニルCoA、スクシニルCoA、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA、グルタリルCoA、CoA、アセチルCoA、ベンゾイルCoA、フェニルアセチルCoA、イソブチリルCoA、イソバレリルCoA、ブチリルCoA、ベーターメチルクロトニルCoA、チグリルCoA、3-ヒドロキシプロピオニルCoA、クロトニルCoA、ヘキサノイルCoA、メチルマロニルCoA、プロピオニルCoA、アクリロイルCoA、アラキドイルCoA、デカノイルCoA、エライドイルCoA、オレオイルCoA、パルミトレオイルCoA、パルミトイルCoA、リノレオイルCoA、ローロイルCoA、ミリストレオイルCoA、ナーボノイルCoA、ステロイルCoA、オクタノイルCoA、ミリストイルCoA、アラキドニルCoA、ヘプタデカノイルCoA、ノナデカノイルCoA、ドコサヘキサノイルCoA、ペンタデカノイルCoA、ベーターヒドロキシブチリルCoA、ヘプタノイルCoA、バレリルCoA、デカノイルCoAなどが挙げられる。

#### 【0014】

N-アシルCoA類の具体例としては、N-ブチリルCoA、N-デカノイルCoA、N-ヘキサノイルCoAなどが挙げられる。

#### 【0015】

チオール基が酸化的に結合したCoA酸化体類の具体例としてはCoA酸化体、CoAグルタチオンジスルフィドなどが挙げられる。

#### 【0016】

なかでも、アセチルCoA、CoA、スクシニルCoA、アセトアセチルCoA、3-ヒド

ロキシ-3-メチルグルタリルCoA、プロピオニルCoA、メチルマロニルCoA、マロニルCoA、3-ヒドロキシプロピオニルCoA、アクリロイルCoA、オレオイルCoA、ステアロイルCoA、リノレオイルCoA、アラキドニルCoA、パルミトイルCoA、ステロイルCoA、CoA酸化体、CoAグルタチオンジスルフィドなどが好ましく、特にアセチルCoA、CoA、スクシニルCoA、アセトアセチルCoA、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA、プロピオニルCoA、メチルマロニルCoA、マロニルCoA、CoAグルタチオンジスルフィドといった短鎖（C8以下）脂肪酸CoAエステル類、チオエステル類などの測定に適している。

## 【 0 0 1 7 】

強酸性溶液は一般的に生体試料をタンパク変性、測定対象化合物を抽出する際に使用する溶液であり、好適な具体例としてはトリクロロ酢酸溶液、過塩素酸溶液などが挙げられる。具体的抽出方法は特に限定するものではなく、測定する試料、測定対象により適宜選択するものであり、例えば骨格筋や脳などの生体組織を液体窒素で凍結後粉碎し、上記強酸性溶液で所定濃度となるように加え、充分に攪拌した後遠心分離し、その上清を生体試料抽出溶液とする。

## 【 0 0 1 8 】

添加する内部標準物質の好適な具体例は上記のCoA類かそれらの同位体である。内部標準法の性格からすれば、測定対象CoAと内部標準物質は物理的性質、化学的性質などが類似であり、本法の過程においてできるだけ両者が同じ挙動を示すが、検出する際には、互いに干渉せず分離できる関係が好ましい。かかる関係を満足する為に以下のような内部標準物質の選択基準を満たすようなCoA類縁体、CoA同位体を選択するのが好ましい。

## 【 0 0 1 9 】

CoA類縁体は測定対象CoAと比較して、炭素数差が3個以内であり、測定対象CoAの主炭素鎖がアルコール、アミン、カルボン酸などの官能基を有する場合は、内部標準物質も同様の官能基を有することが好ましい。またCoA同位体は、測定対象CoAのアシル基の主炭素鎖の水素が3個以上重水素に置き換わっているものであって、かつ上記CoA類縁体の基準を満たすものが好ましい。

## 【 0 0 2 0 】

一方でCoA類は、基本的には生体由来のものが存在する為、使用する内部標準物質としては前記重水素体やN-アシルCoAなど人工的に合成したものが好ましい。マロニルCoAの測定にはアセチルCoAを内部標準物質として使用することは出来ず、アセチルCoA-d3体、アセトアセチルCoA-d3体、アセトアセチルCoA-d5体、メチルマロニルCoA-d3体、メチルマロニルCoA-d5体、プロピオニルCoA-d3体、プロピオニルCoA-d5体、プロピオニルCoA-d7体、スクシニルCoA-d4体を使用する。

#### 【 0 0 2 1 】

内部標準物質の添加は強酸性溶液にて生体試料中からCoAを抽出した上清に添加するか、強酸性溶液中に初めから加えておくかのどちらでもよい。

#### 【 0 0 2 2 】

HPLC注入サンプルの調整において、注入サンプルは無機塩基、有機塩基、塩などによりpHを3～10に調整する。なかでもpHが5～8の中性領域で測定するのが測定感度、再現性、安定性の点から好ましい。無機塩基の好適な具体例としてはナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属の水酸化物、カルシウムなどアルカリ土類金属の水酸化物、アンモニア水などが挙げられる。有機塩基の好適な具体例としてはアニリンなどの1級アミン、ジエチルアミンなどの2級アミン、トリエチルアミンなどの3級アミンなどが挙げられる。塩の好適な具体例はリン酸塩、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウム、炭酸アンモニウムなどが挙げられる。

#### 【 0 0 2 3 】

脳など生体試料中のCoA類の濃度が低い試料測定、高感度分析を行なうに当たっては濃縮操作を実施する。濃縮の好適な方法としては、凍結乾燥、減圧濃縮、液液抽出、固相抽出、オンライン濃縮などが挙げられるが、なかでも固相抽出が好ましい。固相抽出は、逆相系、順相系、イオン交換性などの市販カートリッジがあるが、逆相系カートリッジが再現性が良く、CoA類測定に適している。具体的抽出方法は特に限定するものではなく、測定する試料、測定対象により適宜選択するものである。例えば、カートリッジを有機溶媒と水系溶媒などを用いて一般的に行うコンディショニング操作を施した後、生体試料中から強酸性溶液で抽出したCoA類の抽出上清をカートリッジにアプライし、水系溶媒で洗浄する。こ



こで使用する水系溶媒に酸塩基または塩類が含有していてもよい。

【0024】

また水系溶媒には、固相抽出で使用される一般的な有機溶媒、例えばメタノール、アセトニトリル、2-プロパノール、アセトン、テトラヒドロフランなどと水との混合液を使用することも可能であるが、測定対象CoAと内部標準物質が固相カートリッジに保持されて溶出してこないような組成に調整する。その後、溶出溶媒を使用して、カートリッジに保持した測定対象CoAと内部標準物質を溶出する。溶出溶媒は固相抽出で使用される一般的な有機溶媒、例えばメタノール、アセトニトリル、2-プロパノール、アセトン、テトラヒドロフランなどと水の混合液を使用し、混合比率（0～100％）は測定対象のCoA及び内部標準物質の溶出動態及び夾雑物の溶出動態から適宜決定する。溶出溶媒には酸塩基または塩が含有されていてもよい。マロニルCoAなどの短鎖脂肪酸CoAエステルの場合、数％の有機溶媒溶液で溶出が可能であるが、その後の溶媒留去のため40～75％で行なうのが好ましい。100％近くになると夾雑物溶出の影響がある。その後溶出液の溶媒を留去して、再溶解液で残渣を再溶解する。

【0025】

CoA類と内部標準物質のHPLC分離において、液体クロマトグラフ用分離カラムは一般的に逆相クロマトグラフィー用として市販されているものを使用すればよいが、なかでもオクタデシル基が結合しているシリカベースの充填剤が好ましい。カラムサイズは市販されている分析用のものでよく、内径1mm以上10mm以下で、長さが50mm以上250mm以下のもので測定が可能である。移動相は逆相HPLCで通常用いられる溶媒を使用し、好ましくは酢酸アンモニウムなどの塩が含有されている方がよい。

【0026】

CoA類と内部標準物質の質量分析計による検出において、質量分析計の好適な具体例は四重極型、セクター型、トリプル四重極型、イオントラップ型、飛行時間型、四重極飛行時間ハイブリッド型などが挙げられる。なかでも四重極型、トリプル四重極型が好ましく、特にトリプル四重極型が最も好ましい。検出条件は化合物に応じたマスユニットを設定し、分析カラム上で分離されたピークを検出

する。

# 【 0 0 2 7 】

検出された測定対象CoAと内部標準物質の面積比からの定量において、検量線用に調整したサンプルを上記検出条件を用いて測定し、得られた測定対象CoAと内部標準物質とのピーク面積比と濃度を用いて検量線を作成する。検量線は最小二乗法による一次回帰直線から作成し、実サンプル測定で得られた測定対象CoAと内部標準物質とのピーク面積比を逆算回帰させ、測定対象CoAの濃度を算出する。

# 【 0 0 2 8 】

## 〔実施例 1〕

以下に本発明のCoA類の測定方法について、筋肉中のマロニルCoAの測定の実施例を示す。

# 【 0 0 2 9 】

## 〔標準溶液の調製〕

マロニルCoA リチウム塩、数mgを精密天秤で量りとり、正確に10mg/mlの濃度になるように6%過塩素酸で溶解し標準原液とした。この標準原液を6%過塩素酸で希釈することにより、次表の割合で標準溶液SS-1～SS-5を調製した。

# 【 0 0 3 0 】

【表 1】

| 標準溶液番号 | 調製濃度( $\mu$ g/ml) |
|--------|-------------------|
| SS-5   | 10                |
| SS-4   | 5                 |
| SS-3   | 2                 |
| SS-2   | 1                 |
| SS-1   | 0.5               |

# 【 0 0 3 1 】

## 〔内部標準溶液の調整〕

スクシニルCoA-d4体を数mgを精密天秤で量りとり、正確に10mg/mlの濃度になるように6%過塩素酸で溶解し標準原液とした。この標準原液を6%過塩素酸で希釈することにより、5 $\mu$ g/mlの溶液を調製した。尚、スクシニルCoA-d4体

は、原料にCoAと、こはく酸-d4を用いてSimonの方法 (Simon,E.J.,J.A.C.S.,1953,75,2520) に従って合成した。

## 【 0 0 3 2 】

## [使用機器]

測定に際しては、以下に記載のある装置、機器を使用した。

HPLCシステム : Agilent 1100 (Agilent)

オートサンプラー : Shimadzu SIL-HTc (島津製作所)

質量分析装置MS/MSシステム : API3000 (Applied Biosystems)

## 【 0 0 3 3 】

## [検量線用試料の調製]

標準溶液 (SS-1~SS-5) 1 0 0  $\mu$  lに、スクシニルCoA-d4体溶液 2 0  $\mu$  lを添加したものを検量線用試料 (S1~S5) とした。

## 【 0 0 3 4 】

## [生体試料抽出液の調整]

Wistarラットの筋肉組織を液体窒素中で凍らせ粉々に粉砕した後、6 %過塩素酸を5 ml / g dry wt.になるように加え、よく攪拌した。9 0 0 0回転で遠心分離し、上清を生体試料抽出液とした。

## 【 0 0 3 5 】

## [QC試料の調製]

(1) ブランク試料 : 生体試料抽出液の調整と同じように処理した上清を複数プールしたものの5 0  $\mu$  lに6 %過塩素酸 5 0  $\mu$  l、スクシニルCoA-d4体溶液 2 0  $\mu$  lを加えてよく攪拌したものをブランク試料とした。

## 【 0 0 3 6 】

(2) 0.5  $\mu$  g/ml添加試料 : 生体試料抽出液の調整と同じように処理した上清を複数プールしたものの5 0  $\mu$  lに、標準溶液 0.5  $\mu$  l/ml (SS-2) 5 0  $\mu$  l、スクシニルCoA-d4体溶液 2 0  $\mu$  lを加えてよく攪拌した。

## 【 0 0 3 7 】

(3) 2  $\mu$  g/ml添加試料 : 生体試料抽出液の調整と同じように処理した上清を複数プールしたものの5 0  $\mu$  lに、標準溶液 2  $\mu$  g/ml (SS-4) 5 0  $\mu$  l、スクシニルCo

A-d4体溶液 20  $\mu$ l を加えてよく撹拌した。

【0038】

〔測定試料の調製〕

生体試料抽出液 50  $\mu$ l に 6% 過塩素酸 50  $\mu$ l、スクシニルCoA-d4体溶液 20  $\mu$ l を加えてよく撹拌した。

【0039】

〔注入試料の調整〕

上記試料を ISOLUTE C18(EC) カートリッジを用いて固相抽出を行い、溶出溶媒を留去させた後、2 mM 酢酸アンモニウムで再溶解させ、注入試料とした。

【0040】

〔HPLC 条件〕

HPLC の分析条件は、分析カラムとして AQUA C18、ガードカラムとして AQUA C18 用ガードカラムを使用し、カラム温度 25℃、移動相は 2mM 酢酸アンモニウム水溶液 (A 液) および メタノール (B 液) を使用し、流速 1 ml/min で、表 2 に示すグラジエント条件で行なった。

【0041】

【表 2】

| min  | A (%) | B (%) |
|------|-------|-------|
| 0    | 98    | 2     |
| 1    | 98    | 2     |
| 5    | 50    | 50    |
| 5.5  | 50    | 50    |
| 5.75 | 98    | 2     |
| 8    | END   |       |

【0042】

〔MS 条件〕

質量分析は、イオン化法 (ターボイオンスプレー、ポジティブモード) で行い、マロニルCoA イオン (Q1:854(m/z)、Q3:347(m/z))、スクシニルCoA-d4体イオン (Q1:872(m/z)、Q3:347(m/z)) を測定した。

【0043】

## 【結果】

(1) 直線性：検量線用試料(S1～S5、各濃度n=2)を、上記分析法に従って測定し、検量線を作成した(表3)。相関係数(r)は0.9928、相対誤差は-5.0～+12.7%と、良好な値を示した。

【0044】

【表3】

|        | 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       |       |       |
|--------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
|        | 0.5                     | 1     | 2     | 5     | 10    |
| 1      | 0.51                    | 0.91  | 1.70  | 4.56  | 9.22  |
| 2      | 0.62                    | 1.14  | 2.10  | 5.43  | 10.88 |
| mean   | 0.56                    | 1.02  | 1.90  | 5.00  | 10.01 |
| RE (%) | +12.70                  | +2.25 | -5.00 | -0.10 | +0.10 |

【0045】

(2) QC試料：QC試料を上記分析法に従って測定し、得られたピーク面積を検量線にあてはめて測定値を算出し、測定値の平均値とばらつき(SD)、および精度(変動計数CV)を求めた。また、ブランク試料を除くQC試料は測定値とブランク試料の平均値との差と、添加した標準溶液の理論値とを比較し、各ポイントにおいて相対誤差REを求め、測定系の信頼性を確認した。表4に示すように、CVは2.12～3.71%、REは-9.60～+4.27%と良好な結果が得られた。尚、ブランク試料のクロマトグラムは図1のとおりである。

【0046】

(3) サンプル測定：表5に示すように、サンプル番号V1～V7の7サンプルを測定し、すべて検量線の範囲内で測定できた。

【0047】

【表 4】

| QC | Blank | Blank+0.5 $\mu$ g/mL | RE     | Blank+2 $\mu$ g/mL | RE     |
|----|-------|----------------------|--------|--------------------|--------|
| 1  | 0.501 | 0.745                | -8.53% | 1.42               | -9.63% |
| 2  | 0.523 | 0.758                | -3.33% | 1.51               | -0.63% |
| 3  | 0.525 | 0.777                | 4.27%  | 1.52               | 0.37%  |
| CV | 2.58% | 2.12%                | -      | 3.71%              | -      |

【0048】

【表 5】

## 筋肉中のマロニル CoA 量

|    | nmol/g dry wt |
|----|---------------|
| V1 | 4.58          |
| V2 | 3.18          |
| V3 | 5.85          |
| V4 | 4.08          |
| V5 | 3.71          |
| V6 | 3.88          |
| V7 | 6.04          |

【0049】

## 【実施例 2】

本発明の CoA 類の測定方法について、脳中のマロニル CoA の測定の実施例を示す。

【0050】

## 【標準溶液の調製】

実施例 1 と同様の方法で、以下の濃度になるように溶液を調整した。

【0051】

【表 6】

| 標準溶液番号 | 調製濃度 ( $\mu$ g/ml) |
|--------|--------------------|
| SS-3   | 1                  |
| SS-2   | 0.5                |
| SS-1   | 0.2                |

## 【0052】

## 〔検量線用試料の調製〕

標準溶液(SS-1~SS-3) 200  $\mu$ lに、6%過塩素酸 50  $\mu$ l、スクシニルCoA-d4 体溶液 20  $\mu$ lを加えてよく攪拌したものを検量線用試料 (S1~S3) とした。

## 【0053】

## 〔生体試料抽出液の調整〕

Wistarラットの脳組織を液体窒素中で凍らせ粉々に粉砕した後、6%過塩素酸を 5ml/g dry wtになるように加え、よく攪拌した。9000回転で遠心分離し、上清を生体試料抽出液とした。

## 【0054】

## 〔QC試料の調製〕

(1) ブランク試料：生体試料抽出液の調整と同じように処理した上清を複数プールしたもの 200  $\mu$ lに6%過塩素酸 50  $\mu$ l、スクシニルCoA-d4体溶液 20  $\mu$ lを加えてよく攪拌したものをブランク試料とした。

## 【0055】

(2) 0.5  $\mu$ g/ml添加試料：生体試料抽出液の調整と同じように処理した上清を複数プールしたもの 200  $\mu$ lに、標準溶液 0.5  $\mu$ g/ml 50  $\mu$ l、スクシニルCoA-d4体溶液 20  $\mu$ lを加えてよく攪拌した。

## 【0056】

(3) 2  $\mu$ g/ml添加試料：生体試料抽出液の調整と同じように処理した上清を複数プールしたもの 200  $\mu$ lに、標準溶液(2  $\mu$ g/ml)を 50  $\mu$ l、スクシニルCoA-d4体溶液 20  $\mu$ lを加えてよく攪拌した。

## 【0057】

## 〔測定試料の調製〕

生体試料抽出液 200  $\mu$ lに6%過塩素酸 50  $\mu$ l、スクシニルCoA-d4体溶液 20  $\mu$ lを加えてよく攪拌した。

## 【0058】

## 〔結果〕

(1) 直線性：検量線用試料(S1~S3、各濃度n=2)を前記分析法に従って測定

し、検量線を作成した。表 7 に示すように、相関係数 (r) は 0.9732、相対誤差は -3.1 ~ +4.75% と概ね良好であった。

【0059】

【表 7】

検量線と QC

|        | 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       |
|--------|-------------------------|-------|-------|
|        | 0.2                     | 0.5   | 1     |
| 1      | 0.186                   | 0.421 | 0.89  |
| 2      | 0.238                   | 0.648 | 1.12  |
| mean   | 0.210                   | 0.485 | 1.005 |
| RE (%) | +4.75                   | -3.10 | +0.50 |

| QC | Blank | Blank+0.5 $\mu\text{g/mL}$ | RE     | Blank+2 $\mu\text{g/mL}$ | RE     |
|----|-------|----------------------------|--------|--------------------------|--------|
| 1  | 0.276 | 0.367                      | -12.0% | 0.686                    | 1.75%  |
| 2  | 0.276 | 0.369                      | -10.0% | 0.678                    | -0.25% |
| 3  | 0.285 | 0.370                      | -9.0%  | 0.664                    | -3.75% |
| CV | 6.91% | 0.91%                      | -      | 2.34%                    | -      |

【0060】

(2) QC 試料: QC 試料を分析法に従って測定し、得られたピーク面積を検量線にあてはめて測定値を算出した。測定値の平均値とばらつき SD、および精度 (変動計数 CV) を求めた。また、ブランク試料を除く QC 試料は測定値とブランク試料の平均値との差と、添加した標準溶液の理論値とを比較し、各ポイントにおいて相対誤差 RE を求め、測定系の信頼性を確認した。CV は 0.91 ~ 6.91%、RE は -12.0 ~ +1.75% と良好な結果が得られた。

【0061】

(3) サンプル測定: 表 8 に示すように、サンプル番号 B1 ~ B7 の 7 サンプルを測定し、すべて検量線の範囲内で測定できた。

【0062】



【表 8】

脳中マロニル CoA 濃度

|    | nmol/g dry wt |
|----|---------------|
| B1 | 0.309         |
| B2 | 0.211         |
| B3 | 0.300         |
| B4 | 0.206         |
| B5 | 0.294         |
| B6 | 0.238         |
| B7 | 0.226         |

【 0 0 6 3 】

## 【発明の効果】

以上により、本発明による測定法によれば、生体試料中のCoA類をLC-MSを用いて、正確に再現性よく定量的に測定することが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

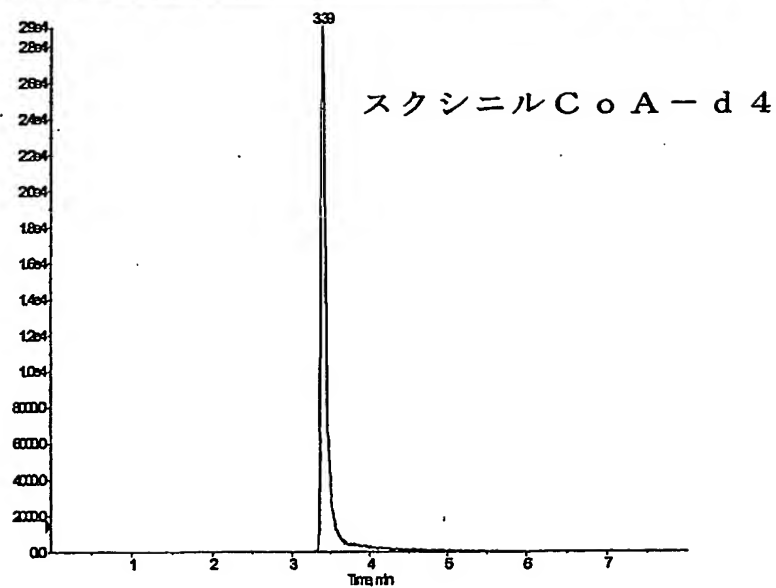
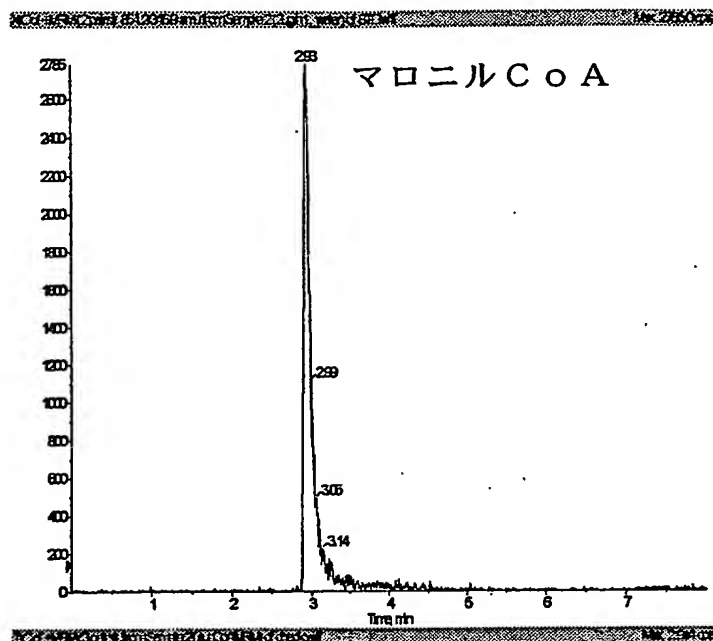
マロニルCoA、スクシニルCoA-d4体のクロマトグラム。

【書類名】

図面

【図1】

ブランク試料のクロマトグラム



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体試料中の補酵素A類の高感度で再現性に優れた濃度測定法を提供する。

【解決手段】 生体試料中の補酵素A類の濃度を測定する方法であり、生体試料を強酸性溶液を使用して抽出するステップ、内部標準物質を添加するステップ、固相抽出ステップ、LC-MSを用いて検出するステップを備えることを特徴とする補酵素A類の測定方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003001]

|          |                     |
|----------|---------------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 8月28日         |
| [変更理由]   | 新規登録                |
| 住 所      | 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 |
| 氏 名      | 帝人株式会社              |